

# Fókuszban a szöveti biomarkerek

## *Az ösztrogének mint a szövetspecifikus immunválasz és autoimmunitás modulálásának kulcsszereplői*

Vásárhelyi Barna dr.<sup>1, 2, 3</sup> ■ Mészáros Katalin<sup>1, 4</sup> ■ Karvaly Gellért<sup>1, 3</sup>  
Patócs Attila dr.<sup>1, 3, 4</sup>

<sup>1</sup>Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet, Budapest

<sup>2</sup>Magyar Tudományos Akadémia–Semmelweis Egyetem,

Gyermekgyógyászati és Nefrológiai Kutatócsoport, Budapest

<sup>3</sup>Bionikai Innovációs Központ Nonprofit Kft., Budapest

<sup>4</sup>Magyar Tudományos Akadémia–Semmelweis Egyetem,

„Lendület” Örökletes Endokrin Daganatok Kutatócsoport, Budapest

Az ösztrogének modulálják az immunválaszt és az autoimmun betegségek kialakulását, lefolyását. Hatásaikat magreceptorok (azaz ösztrogénreceptor-alfa és ösztrogénreceptor-béta) mellett membránreceptorok közvetítik, illetve egyéb hormonokkal való kölcsönhatásaik befolyásolják. A szöveti homeosztázis fenntartásában a lokálisan képződő hormonoknak van elsődleges szerepe. Az immunrendszer a szervezetünk egyik legdinamikusabban változó rendszere. Citokintermelésük révén hatásuk a szervezet minden sejtjét érinti. Ugyanakkor az immunsejtek is szabályozás alatt állnak, a kiváltott hatást az immunsejtek fejlődési stádiuma is meghatározza. Klinikai megfigyelések bizonyítják, hogy a nemi hormonok közül az ösztrogéneknek szerepe lehet a különböző típusú autoimmun betegségekben. A B-sejt-mediált kórképek lefolyását az ösztrogének súlyosbítják. T-sejt-mediált kórképekben a hatás a Th1- vagy Th2-dominanciától függ: az ösztrogén az immunválasz Th2 jellegét erősíti, ezért azok a betegségek, amelyekre Th2-dominancia jellemző, ösztrogén hatására súlyosbodnak, míg a Th1-domináns betegségek enyhülnek. A gyulladás önmagában is befolyásolhatja az ösztrogének immunsejtekre kifejtett hatásait. A gyulladásos citokinek megváltoztathatják az ösztrogénreceptorok expresszióját, funkcióját, de a perifériás ösztrogénmetabolizmuson keresztül a ligand elérhetősége is fontos tényező. A helyi, szöveti rendszer monitorozása, a rendszerben részt vevő molekulák felismerése, mennyiségük meghatározása döntő jelentőségű a mechanizmusok megismerésében és új diagnosztikai, illetve terápiás eljárások kidolgozásában. Jelenleg a napi, laboratóriumi gyakorlatban mért molekulák korlátozottan alkalmasak az ösztrogének szövetspecifikus hatásainak monitorozására. Jelen összefoglalóban a szerzők áttekintik az ösztrogének immunválaszban betöltött szerepét és összefoglalják azokat az új laboratóriumi módszereket, amelyek segítséget jelentenek a lokális hatások nyomon követésében. *Orv. Hetil.*, 2015, 156(51), 2070–2076.

**Kulcsszavak:** ösztrogén, gyulladás, autoimmunitás, rheumatoid arthritis, szisztémás lupus erythematosus

## Focusing on tissue biomarkers

### *Estrogens as key players in the modulation of immune response and autoimmunity*

Estrogens modulate the immune response as well as the risk and progression of autoimmune disorders. Their effects are mediated by nuclear receptors (i.e. estrogen receptor alpha and beta), membrane receptors, and are influenced by their interactions with other hormones. Locally produced hormones and cytokines are the main factors in maintaining tissue homeostasis. The response of immune cells to estrogens is related to their developmental stage. The diverse effects of estrogens on various autoimmune disorders are the result of the versatility of their pathomechanism. In general, progression of B-cell mediated disorders is aggravated by estrogens. Their effects on T-cell mediated disorders, on the other hand, are driven by Th1 or Th2 dominance. As estrogens promote the escalation of the Th2 immune response, Th2-dominant disorders are aggravated, while Th1-dominant disorders are ameliorated upon high estrogen levels. Inflammation on its own also modulates the impact of estrogens. Inflammatory cytokines alter the expression of the alpha and beta estrogen receptors as well as the activity of estrogen metabolizing enzymes. Monitoring the local, tissue-wide interaction between hormones and immune cells would provide a better tool for identification and characterization of molecules involved in this system. To date, routinely used laboratory methods have a

limited role in monitoring the local effects of estrogens. In this current paper the authors summarize the role of estrogens in immune system and overview those novel methods which are useful in the investigation of local endocrine milieu.

**Keywords:** estrogen, tissue-specific hormone effect, inflammation, autoimmunity, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus

*Vásárhelyi, B., Mészáros, K., Karvaly, G., Patócs, A.* [Focusing on tissue biomarkers. Estrogens as key players in the modulation of immune response and autoimmunity]. *Orv. Hetil.*, 2015, 156(51), 2070–2076.

(Beérkezett: 2015. október 5.; elfogadva: 2015. október 29.)

## Rövidítések

APC = antigén-prezentáló sejtek; DC = dendritikus sejtek; E1 = öszttron; E2 = öszttradiol; ER = ösztrogénreceptor; GC = gáz-kromatográfia; LC = folyadék-kromatográfia; LC-MS/MS = folyadék-kromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométer; LPS = lipopoliszacharid; MS = tömegspektrométer; RA = rheumatoid arthritis; SLE = szisztémás lupus erythematosus; SM = sclerosis multiplex; Treg = regulátoros T-sejtek

Számos autoimmun betegség, így a szisztémás lupus erythematosus (SLE), a rheumatoid arthritis (RA) vagy a sclerosis multiplex (SM) inkább a nőket, mint a férfiakat sújtja. Ennek hátterében elsősorban az eltérő endokrin környezet, az ösztrogéndominancia állhat [1]. Az ösztrogének autoimmun kórképekben játszott jelentőségére utal az is, hogy terhességben megváltozhat a betegség aktivitása. A terhesség hatása betegségenként eltérő: míg a várandósság ideje alatt az SLE fellángol, addig az SM és az RA inkább remisszióba kerül [2]. Az exogén ösztrogének kórképekre gyakorolt hatásai is eltérőek. Az ösztrogénpótlás az SLE lefolyását súlyosbítja, míg RA-ban potenciális terápiás eszköz [3]. Az ösztrogén különböző típusú autoimmun betegségekre gyakorolt eltérő hatásait az eltérő patomechanizmus magyarázza. Összességében a B-sejt-mediált kórképekben az ösztrogének káros hatásúak. T-sejt-mediált kórképekben a hatás a Th1- vagy Th2-dominanciától függ: mivel az ösztrogén az immunválasz Th2 jellegét erősíti, ezért azok az autoimmun betegségek, amelyekre Th2-dominancia a jellemző, ösztrogén hatására súlyosbodnak, míg a Th1-domináns betegségek enyhülnek.

## Az ösztrogének immunsejtekre gyakorolt hatásai

Az ösztrogének közvetlenül csak azoknak a sejteknek tudják a működését befolyásolni, amelyek ösztrogénreceptort (ER) expresszálnak. Az immunrendszer egyes elemeiben eltérő mértékben és arányban jelennek meg az ER-ek. A klasszikus útvonal során az intracelluláris ER a ligand megkötése után dimerizálódik [4], bejut a sejt-

magba, ahol kötődik a genomban az úgynevezett estrogen response element (ERE) szakaszokhoz, serkentve vagy gátolva a célgének átírását. A klasszikus hatások mellett az úgynevezett nem klasszikus útvonalak is aktiválódnak ER-en keresztül [5]. Ebben a rendszerben főleg a sejtmembránban található ER-ek aktiválódnak az extracelluláris térben található ligandok hatására.

Két fő ER ismert: az ER- $\alpha$  és az ER- $\beta$ . Az ER- $\alpha$  kimutatható thymocytákban, csontvelői nem haematopoietikus sejtekben, T- és B-sejt-prekurzorokban, illetve kerin-gő B-sejtekben [4]. Az ER- $\alpha$  a CD4+ T-sejtekben, az ER- $\beta$  a B-sejtekben domináns. A CD8+ T-sejtek az ER- $\alpha$ -t és ER- $\beta$ -t azonos arányban, de kismértékben expresszálják. Az ER- $\alpha$  és ER- $\beta$  aránya az egyes sejtek érése során változik.

Az ER- $\alpha$  és az ER- $\beta$  a gyulladásos folyamatok során kulcsszereplő sejtek közül az antigén-prezentáló sejtekben (APC), a dendritikus sejtekben (DC) és monocytamachrophagokban expresszálódik (bár eltérő arányban) [4]. A DC differenciálódását a csontvelői sejtektől az öszttradiol elősegíti. Ösztrogénszegény környezetben a DC-k differenciálódása gátlás alá kerül. Kis dózisú ösztrogén jelenlétében a DC-k APC-funkciói javulnak, például fokozódik az MHCII- és CD86-expressziójuk.

Monocytákban az ER-ek expressziója, az ER- $\alpha$  és ER- $\beta$  aránya a differenciálódás stádiumától függ: a monocytákon az ER- $\beta$ , míg a macrophagokon az ER- $\alpha$  dominál. Az ösztrogén az ER- $\alpha$ -domináns macrophagokon apoptózist indukál, míg az ER- $\beta$ -domináns monocytákon nem. Az ösztrogének a macrophagok gyulladásos mediátor termelését sokrétűen befolyásolják: fokozzák a TNF- $\alpha$ -t, illetve csökkentik az IL-10-termelést [6]. A macrophagok által termelt TNF- $\alpha$  és IL-1 $\beta$  mennyisége a havi ciklustól függően változó (lutealis fázisban magasabb, mint a follicularisban) [7]. Egyúttal azonban van gyulladásgátló hatásuk is, mivel csökkentik a CCR2 és CXCR3 kemokin receptorok expresszióját, illetve a migrációs aktivitást [8].

Az ösztrogének eltérő koncentrációkban gyakran el-lentétes hatást fejtenek ki a monocytákra és macrophagokra. Humán perifériás mononukleáris sejtekben lipopoliszacharid (LPS) jelenlétében az öszttradiol férfiaknál

$10^{-10}$ – $10^{-7}$  M, nőknél  $10^{-8}$ – $10^{-7}$  M koncentrációban gátolta a TNF-képződést – míg LPS nélkül, illetve nagyobb koncentrációban serkentette azt [9].

A terhesség alatt a B-sejtek képződése csökken, ezt a hatást már egyszeri ösztrogéninjekcióval ki lehet váltani [1]. Az ösztrogén adása és a terhesség reverzibilis thymusatropiát vált ki. A B-sejt-progenitorokban mind az ER- $\alpha$ , mind pedig az ER- $\beta$  expresszálódik felnőtt állatokban, viszont a perinatalis időszakban nem. Ennek köszönhetően a B-sejtek lymphopoesise a magas anyai ösztrogén ellenére létrejöhet a magzatban.

Bár a B-sejtek száma csökken, az ösztrogén a humorális immunválaszt serkenti az immunglobulin-termelés fokozásával [10]. Emellett az autoantitestek szintjét is befolyásolja: exogén ösztrogén hatására SLE-s egerekben nőtt az anti-DNS IgG-szintje, illetve egy nagyobb affinitású anti-DNS-antitest termelődése fokozott [11].

Az ösztrogén a T-sejtek működését is befolyásolja. A terhesség során ösztrogén hatására a Th1/Th2 arány Th2 irányba tolódik el [12]. Az ösztrogén T helper választ befolyásoló hatása dózisfüggő: magas dózisban a Th2-választ serkenti, az alacsony dózisú ösztrogén viszont stimulálja a Th1-választ, fokozza az antigén-specifikus CD4+ T-sejt-választ és elősegíti az IFN-gamma-termelő sejtek keletkezését [4].

A Th1/Th2 arány mellett az ösztrogén a lymphocyták differenciálódását is meghatározza. Fiziológias dózisban serkenti a regulátoros T-sejtek (Treg) termelődését, elősegíti a Foxp3 gén expresszióját. A Treg-sejt-képződést az ösztrogén közvetve, a dendritikus sejteken keresztül is elősegíti, az ösztrogénkezelt dendritikus sejtek fokozottan tudták indukálni a CD4+CD25+FoxP3+ Treg-sejteket [13].

Exogén ösztrogének kedvező hatást gyakoroltak azokra az autoimmun kórképekre (RA és SM), amelyek hátterében Th1-túlsúly áll [14, 15]. Bizonyos modellekben a Th1-es citokinek szintjét csökkentette, másokban a Th2-es citokinek termelését fokozta. SLE-s betegekben a T-sejt-választ az ösztrogén fokozza: serkenti a T-sejtek válaszkészségét, illetve a B-sejtekkel való kontaktusért felelős CD40 sejtfelszíni receptor expresszióját [16]. A T helper sejtek differenciálódását a DC-sejtekre gyakorolt hatásokon keresztül is befolyásolják. Az ösztrogén-dús környezetben differenciálódott dendritikus sejtek hatására a Th2 lymphocyták keletkezése a jellemző.

## Perifériás ösztrogénmetabolizmus és a gyulladásos markerek közötti kapcsolat

Gyulladásos kórképek esetén nemcsak az ER-típusok aránya, de a nemi hormonok lokális szintjei is megváltoznak. A szisztémás ösztrogénszinttől nagymértékben eltérhet a lokális ösztrogénszint [17]. Az androgénekből a periférián az aromatazenzim-komplex hatására ösztrogének képződhetnek. Az aromataz enzim kóros expressziója esetén lokálisan magas ösztrogénszintek alakulhatnak ki.

Szoros kapcsolatot találtak az aromatazaktivitás és az IL-6-termelés között macrophagban gazdag szövetekben, illetve fibroblast-synoviocytákban [18].

A lokálisan termelt gyulladásos citokinek miatt fokozott aromatazaktivitás vezethet ahhoz, hogy aktív RA-ban az ízületi folyadék androgénszintje csökken, ösztrogénszintje, különösen az ösztradiol, az ösztron, illetve számos egyéb downstream hidroxilált metabolit szintje pedig nő [19]. A lokálisan, a magas gyulladásos citokinek által indukált aromatazaktivitás eredményeként megváltozik a szöveti androgén/ösztrogén arány. Ez a megváltozott arány egyben proinflammatorikus hatású is: az ösztrogénmetabolitok fokozott képződése stimulálja a gyulladásos és immunreakciókat [20].

Hasonló jelenséget észleltek SLE-betegeknél. SLE-ben a bőrben és a subcutan zsírszövetben mért aromatazaktivitás a kontrollhoz képest nő, fordított arányosságban a betegség aktivitásával. Az androgénszintek alacsonyabbak, a szérumösztrogénszintek magasabbak – összefüggésben az aromatazaktivitással [21].

Az ER-ek érzékenysége a különböző ösztrogénmetabolitokkal szemben különböző, emiatt ezek hatása (így immunválaszt befolyásoló hatása) is eltérő. Az egyik legfontosabb gyulladásos mediátor, a TNF-alfa hatására lokálisan az ösztrogéntermelésért (SF-1 és CYP19 [aromataz]) és proinflammatorikus hatású metabolitok (HSD17B1 és CYP1B1) keletkezéséért felelős enzimek génexpressziója nő, az ösztrogént lebontóké (HSD17B2, COMT, NQO1) pedig csökken [22]. Összességében tehát RA-ban a synovialis sejtek lokálisan olyan ösztrogénmetabolitokat – elsősorban  $16\alpha$ -hidroxi-ösztront – termelnek, amelyek a gyulladásos sejtekre proliferatív hatásúak, és nem gátolják a TNF-termelődést (szemben a többi ösztrogénmetabolittal) [20].

## A lokális, szöveti ösztrogénmetabolizmus és az immunválasz közötti interakció monitorizálásának laboratóriumi lehetőségei

### Ösztrogének és metabolitjaik mérése

Az eddigi tapasztalatok azt mutatják, hogy a szisztémás ösztrogénszintek nem tükrözik a szöveti viszonyokat, így ezek információs értéke a lokális immunreakció vizsgálatában korlátozott. Ezzel szemben mind az ösztron (E1), illetve az ösztradiol (E2), mind pedig metabolitjaik lokális koncentrációi hatékonyan jelzik a fokozott ösztrogéntermeléssel járó folyamatokat [23, 24, 25, 26]. Ezek értékelése gyakran az androgén/ösztrogén arányon alapul, mivel a hormonszintek immunrendszeri aktivációt követő megváltozása nemtől függ: férfiakban az arány emelkedése döntően az androgén hormonok szintjének csökkenése, nőkben pedig az ösztrogén hormonok szintjének emelkedése révén tolódik el [25].

Az E1 és az E2 átalakítását a májban és a perifériás szövetekben legalább 15, a CYP450-csoportba tartozó izoenzim végzi. Az átalakítás első lépése hidroxiláció a 2., 4. vagy 16. pozícióban, amelyet 2. fázisú továbbalakítás – metiláció, szulfatálás, emellett szisztémásan glukuronidkonjugáció – követ [27]. A keletkező metabolitok egy része hormonálisan aktív és genotoxikus; közülük kiemelkedő az ER-hez kovalensen kapcsolódó 16 $\alpha$ -hidroxi-ösztroon, valamint a 16 $\alpha$ -hidroxi-ösztrodiol aktivitása. Az egyes metabolitok keringő és szöveti szintjei abszolút és relatív értelemben is jelentősen eltérnek, mint ahogy szöveti hatásaik is [28].

Az ösztrogénmetabolitok proinflammatorikus hatását legalább részben magyarázza, hogy eltérő és dóziszfüggő mértékben fokozzák a monocyták sejtproliferációját. A 16 $\alpha$ -hidroxi-ösztroon és a 2-hidroxi-ösztrodiol alacsony és magas koncentrációban egyaránt; a 2- és 4-hidroxi-ösztroon alacsony, a 4-hidroxi-ösztrodiol és a 16 $\alpha$ -hidroxi-ösztrodiol pedig magas koncentrációban mutatta ezt a hatást [29].

A megnövekedett ösztrogéntermelést legkorábban az aromatazaktivitás fokozódásán keresztül mutatták ki az emlő rosszindulatú elváltozásainak diagnosztizálásához [30]. Jelenleg is érvényes az egyesült államokbeli Környezetvédelmi Ügynökség (Environmental Protection Agency) módszertani ajánlása, amely az aromatazaktivitás jellemzését a tríciummal jelzett androsztendionból felszabaduló triciált víz ( $^3\text{H}_2\text{O}$ ) szcintillációs elven alapuló vizsgálatával javasolja. Ez az ajánlás az aromatazinhibitorok hatékonyságának összehasonlításához készült, módszertanilag azonban a szöveti aromatazaktivitás vizsgálatát követi [31, 32].

A keringő ösztrogének közvetlen kimutatását jelenleg elsősorban immunoassay módszerek (ELISA, radioimmunoassay) segítségével végzik. Általános vélekedéssé vált azonban, hogy ezek analitikai teljesítményjellemzőinek elfogadhatósága megkérdőjelezhető. A kialakult bizalmatlanságot markánsan igazolja, hogy a College of American Pathologists által 2008-ban lebonyolított szteroid külső körvizsgálatban azonos immunoassay módszerrel kapott E2-eredmények között kilencszeres eltérés volt [33]. A klinikai diagnosztikában is egyre inkább teret nyerő kromatográfiás (gáz-kromatográfia, GC vagy folyadék-kromatográfia, LC) eljárások segítségével a szteroidvegyületek koncentrációja megbízhatóbban meghatározható. E technológiák legfontosabb előnye, hogy lehetőséget biztosítanak több hasonló szerkezetű vegyület egymás melletti mennyiségi meghatározására viszonylag kis térfogatból. A hasonló szerkezetek elválasztása miatt e vizsgálati módszerek szelektivitása jelentősen nagyobb, mint az immunoassay módszereké. Idevonatkozó példa, hogy az ösztrogének radioimmunoassay módszerrel mért szintjei mintegy 50%-kal voltak magasabbak a gáz-kromatográfiás elválasztást követő tömegspektrometriás (MS) módszerrel kapott értékeknél [34]. A vizelet ösztrogén- és ösztrogénmetabolit-tartalmának vizsgálata hasonló eredményt mutatott, főleg posztme-

nopauzális mintákban, amelyekben a 16 $\alpha$ -hidroxi-ösztroon esetében az eredmények között 12-szeres eltérést is tapasztaltak [35].

A gáz-kromatográfiás elválasztáson alapuló mérési eljárások bonyolult minta-előkészítést igényelnek. Az elmúlt 15 évben ugyanakkor bekerült a klinikai laboratóriumok eszköztárába az egyes teljesítményjellemzőket (érzékenység, specifikusság) és az áteresztőképességet tekintve gyakran előnyösebb, emellett egyszerűbb minta-előkészítést igénylő folyadék-kromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrométer (LC-MS/MS) [30, 36]. Az E1 és E2 teljes metabolitprofiljának szérumban, LC-MS/MS technikával történő vizsgálata igazolta például, hogy egészséges személyek szövetében a 16-hidroxilációs út termékei – elsősorban az ösztroiol konjugált formája – dominálnak [37].

A krónikus gyulladással járó kórképek diagnosztikájával összefüggésben a szöveti ösztrogénmetabolit-profillal kapcsolatos tapasztalatok ezzel együtt korlátozottak. Rheumatoid arthritisben szenvedő betegekből gyűjtött synovialisfolyadék-mintákban az ösztrogének és 4-, illetve 16-hidroxi-metabolitjaik szintje szignifikánsan magasabb volt, mint a kontrollmintákban, amely egyúttal az ösztrogén/androgén arány emelkedésével is járt. Az E1 megnövekedett koncentrációja fokozott aromatazaktivitást tükrözött [25]. Vizeletvizsgálatok alapján ugyanakkor úgy tűnik, a 2-hidroxi-ösztrogének szintje mind relatív, mind abszolút értelemben drámaian csökken [19]. *Peng és mtsai* a teljes szöveti ösztrogénprofil vizsgálatát egerek tüdejéből vett mintákban, a dohányfüsttel szembeni expozíció következményeit kutatva. Az expozíció hatására legnagyobb mértékben a kontrollcsoportban is legnagyobb mennyiségben jelen levő metabolitok, a 4-hidroxi-ösztroon és a 4-hidroxi-ösztrodiol mennyisége emelkedett [38]. *Mosli munkacsoportja* az E1 és E2 mellett 5 metabolit szöveti koncentrációját vizsgálta patkányokban, prostatitis indukálását követően. Ők az E1- és E2-, valamint a 16 $\alpha$ -hidroxi-ösztroon- és a 4-hidroxi-ösztrodiol-szintek jelentős növekedését tapasztalták [26].

## Gyulladás markereinek meghatározása

Mivel a rutin laboratóriumi gyakorlatban vizsgált gyulladásos markerek csak igen közvetett információt nyújtanak a lokális folyamatokra vonatkozóan, speciálisabb laboratóriumi vizsgálatok segítségével tudunk csak információt nyerni a Th1- és Th2-sejtek arányáról. Felszíni antigénjeiket tekintve a két sejt nagyon hasonló, mivel ugyanabból a naív, CD4+ T-sejtből származnak. Emiatt áramlási citometriás elkülönítésük sem tartozik a „rutin” áramlási citometriás feladatok közé. Lehetséges azonban ezeknek a sejteknek (és a többi T-sejt-alcsoportnak) az elkülönítése a felszíni antigének (ideértve a sejtek által expresszált kemokinreceptorokat is), az egyes sejtek által termelt citokinek és transzkripciósfaktorok elemzése révén, multiparametrikus áramlási citometriás vizsgálat segítségével [39, 40].



Az, hogy a naiv T-sejtből milyen effektor sejt (Th1 vagy Th2) képződik, azt az immunválaszt kiváltó antigén jellege (intra- vagy extracelluláris kórokozó, paraziták stb.), valamint mikrokörnyezeti hatások, elsősorban az immunválasz korai szakaszában jelen lévő, a környező sejtek által termelt citokinek mennyisége határozza meg [41]. Ezek, valamint további, már az effektor sejtek által termelt citokinek mérése tehát információt adhat a Th1/Th2 sejtek arányáról. A citokinek mennyiségi meghatározása sem rutinfeladat, speciális immunológiai laboratóriumok végzik. Gyakran úgynevezett „vizsgálati panelekben” elérhetők és igen költségesek. A leggyakrabban mért citokinek: IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10. A jelenleg forgalmazott panelek egy része 4–25 citokin egyidejű kimutatását teszik lehetővé, vannak olyanok is, amellyel citokinek mellett kemokinek, növekedési faktorok és gyulladásos markerek is kimutathatók. Ennyi paraméter egyidejű mérésére a legalkalmasabb az úgynevezett biochip immunoassay technológia (biochip array technology), amely ezeknek a paramétereknek gyors, pontos és (a külön elvégzett tesztek árához viszonyítva) költséghatékony mérését teszi lehetővé különböző vizsgálati anyagokból (vér, vizelet, nyál, szövetminták) [42].

A Th1- és Th2-sejtek arányáról információt adhat továbbá azoknak a transzkripciós faktoroknak a kimutatása, amelyek közrejátszanak a két sejt differenciálódási folyamatában, tehát a naiv T-sejt Th1-gyé, illetve Th2-vé alakulásában. A Th1-sejtek differenciálódása (IL-12, valamint interferonok hatására) a STAT1/STAT4 jelátviteli rendszeren és a T-bet transzkripciós faktor segítségével történik, míg a Th2-sejteké (IL-4 hatására) a STAT6 jelátviteli rendszeren keresztül, GATA-3 és c-Maf transzkripciós faktorok közreműködésével [43]. A GATA-3/T-bet arány tehát pontosan tükrözi a Th2/Th1 sejt arányát. Ennek az arálynak a meghatározása történhet immunológiai (immunoassay) vagy molekuláris biológiai (polimeráz láncreakción alapuló) módszerekkel [44, 45].

A fent említett vizsgálatok mindegyike speciális (ezáltal igen költséges) laboratóriumi felszerelést és képzett munkaerőt igényel, amely miatt (például a minta szállítása megfelelő centrumba) a vizsgálatok leletátfordulási (TAT) ideje magasabb lehet a kívánatosnál. Éppen ezért izgalmas lehetne olyan mikrofluidikai rendszer (Lab-on-a-chip) tervezése, fejlesztése, amellyel helyben, rövid idő alatt lehetne gyulladásos markereket és citokineket, kemokineket vizsgálni, ezzel bizonyos betegségek diagnosztikáját gyorsá, pontosabbá tenni.

## Ösztrogénreceptorok autoimmun betegségekben – potenciális terápiás lehetőségek

Általános gyulladásos állatmodellben az ER- $\alpha$ -mRNS-expresszió nőtt, míg az ER- $\beta$ -expresszió csökkent [46]. Ezenkívül a hypoxia, ami általában a gyulladásos állapo-

tokkal együtt jár, csökkenti az ER- $\beta$  expresszióját, míg az oxidatív stressz fokozza az ER- $\alpha$ -ét. Összességében tehát az ER- $\alpha$  gyulladástól függő módon upregulálódik az ER- $\beta$ -hoz képest. Ennek azért van nagy jelentősége, mert az ER- $\beta$  az ösztrogén számos gyulladásgátló hatását közvetíti [47].

Autoimmun betegeknél hasonló jelenségeket mutatnak ki. RA-betegek synovialis szövetében az ER- $\alpha$  és ER- $\beta$  aránya megváltozik, és ez hozzájárul ahhoz, hogy az ösztrogén proinflammatorikus hatásai dominánssá váljanak. RA-ban kimutatták, hogy az ER- $\alpha$ -sejtek száma magasabb az ER- $\beta$ -sejteknél. Mások is igazolták, hogy RA-ban az ER- $\alpha$ -sejtek denzitása nagyobb a kontrollhoz képest.

SLE-s betegektől származó T-sejtekben az ER- $\beta$  mennyisége alacsonyabb, míg az ER- $\alpha$  mennyisége hasonló volt a kontrollhoz képest; ez az ER- $\alpha$ -nak az ER- $\beta$ -hoz képest relatív emelkedésének felelt meg.

Mindezen megfigyelések alapján érthető, hogy autoimmun betegségekben az ösztrogénválasz modulálásának fontos terápiás következménye lehet. Hagyományosan a hormonpótló kezelést és az orális fogamzásgátló kezelést nem javasolták autoimmun betegségekben [48]. Az újabb megfigyelések szerint azonban RA-ban és SM-ben kedvező hatású lehet az exogén hormonpótlás. SLE-ben az ösztrogénpótlást elsősorban a trombózis kockázata alapján kell mérlegelni; az exogén ösztrogén az enyhébb/közepes mértékű fellángolások kockázatát emelheti, míg a súlyos fellángolások veszélyét nem befolyásolja [3].

Az ER- $\alpha$ /ER- $\beta$  arány ER- $\alpha$  irányba való eltolódása miatt felmerült az ösztrogének antiinflammatorikus hatását közvetítő ER- $\beta$  szelektív serkentése. Az ERB-041 jelű szelektív ER- $\beta$ -agonista különböző állatmodellekben gyulladásgátló volt [49], ennek ellenére egy humán fázis II vizsgálatban nem váltotta be RA-s betegeknél a reményeket [50].

A lokális, döntően inflammatorikus hatású ösztrogén-metabolizmus gátlására elméleti lehetőség az aromatázgátlók adása. Ezeket a készítményeket ösztrogéndependens rákban alkalmazzák a perifériás ösztrogénszintézis gátlására. RA-ban adásuk nem indikált; mellékhatásként ízületi panaszok jelentkezhettek, sőt – eseti beszámolók szerint – akár még RA-t is indukálhatnak [51].

## Következtetések

Az ösztrogénkészítmények több évtizede alkotják a terápiás fegyvertár részét. Az utóbbi évtized kutatási eredményei azonban jelzik: az egyértelmű, endokrinológiailag jól definiálható hatások mellett igen összetett, és csak részleteiben ismert immunmoduláns tulajdonságokkal rendelkeznek. Ez a gyakorló orvost fokozott körültekintésre kell, hogy készítse akkor, amikor immunmediált kórképben szenvedő betege számára ösztrogént rendel.

**Anyagi támogatás:** A közlemény megírása anyagi támogatásban nem részesült.

**Szerzői munkamegosztás:** A szerzők egyenő arányban és mértékben vettek részt az irodalomkutatásban és a közlemény megírásában. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

**Érdekltségek:** A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

## Irodalom

- [1] Lang, T. J.: Estrogen as an immunomodulator. *Clin. Immunol.*, 2004, 113(3), 224–230.
- [2] Märker-Hermann, E., Fischer-Betz, R.: Rheumatic diseases and pregnancy. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 2010, 22(6), 458–465.
- [3] Holroyd, C. R., Edwards, C. J.: The effects of hormone replacement therapy on autoimmune disease: rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Climacteric*, 2009, 12(5), 378–386.
- [4] Cunningham, M., Gilkeson, G.: Estrogen receptors in immunity and autoimmunity. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2011, 40(1), 66–73.
- [5] Zhao, C., Dahlman-Wright, K., Gustafsson, J. Å.: Estrogen signaling via estrogen receptor-beta. *J. Biol. Chem.*, 2010, 285(51), 39575–39579.
- [6] Carruba, G., D'Agostino, P., Miele, M., et al.: Estrogen regulates cytokine production and apoptosis in PMA-differentiated, macrophage-like U937 cells. *J. Cell. Biochem.* 2003, 90(1), 187–196.
- [7] Bouman, A., Moes, H., Heineman, M. J., et al.: The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: increasing sensitivity of human monocytes to endotoxin. *Fertil. Steril.*, 2001, 76(3), 555–559.
- [8] Janis, K., Hoeltke, J., Nazareth, M., et al.: Estrogen decreases expression of chemokine receptors, and suppresses chemokine bioactivity in murine monocytes. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2004, 51(1), 22–31.
- [9] Asai, K., Hiki, N., Mimura, Y., et al.: Gender differences in cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells: role of estrogen in modulating LPS-induced cytokine secretion in an ex vivo septic model. *Shock*, 2001, 6(5), 340–343.
- [10] Kanda, N., Tamaki, K.: Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1999, 103(2 Pt 1), 282–288.
- [11] Bynoe, M. S., Grimaldi, C. M., Diamond, B.: Estrogen up-regulates Bcl-2 and blocks tolerance induction of naive B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, 97(6), 2703–2708.
- [12] Doria, A., Iaccarino, L., Sarzi-Puttini, P., et al.: Estrogens in pregnancy and systemic lupus erythematosus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2006, 1069, 247–256.
- [13] Polanczyk, M. J., Hopke, C., Huan, J., et al.: Enhanced FoxP3 expression and Treg cell function in pregnant and estrogen-treated mice. *J. Neuroimmunol.*, 2005, 170(1–2), 85–92.
- [14] Kim, S., Liva, S. M., Dalal, M. A., et al.: Estriol ameliorates autoimmune demyelinating disease: implications for multiple sclerosis. *Neurology*, 1999, 52(6), 1230–1238.
- [15] Holmdahl, R., Jansson, L., Meyerson, B., et al.: Oestrogen induced suppression of collagen arthritis: I. Long term oestradiol treatment of DBA/1 mice reduces severity and incidence of arthritis and decreases the anti type II collagen immune response. *Clin. Exp. Immunol.*, 1987, 70(2), 372–378.
- [16] Rider, V., Jones, S., Evans, M., et al.: Estrogen increases CD40 ligand expression in T cells from women with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.*, 2001, 28(12), 2644–2649.
- [17] Cutolo, M., Sulli, A., Straub, R. H.: Estrogen metabolism and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, 2012, 11(6–7), A460–A464.
- [18] Schmidt, M., Weidler, C., Naumann, H., et al.: Androgen conversion in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synoviocytes – androstenedione and testosterone inhibit estrogen formation and favor production of more potent 5alpha-reduced androgens. *Arthritis Res. Ther.*, 2005, 7(5), R938–R948.
- [19] Cutolo, M., Villaggio, B., Serio, B., et al.: Synovial fluid estrogens in rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.*, 2004, 3(3), 193–198.
- [20] Schmidt, M., Hartung, R., Capellino, S., et al.: Estrone/17beta-estradiol conversion to, and tumor necrosis factor inhibition by, estrogen metabolites in synovial cells of patients with rheumatoid arthritis and patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, 2009, 60(10), 2913–2922.
- [21] Folomeev, M., Dougados, M., Beaune, J., et al.: Plasma sex hormones and aromatase activity in tissues of patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 1992, 1(3), 191–195.
- [22] Salama, S. A., Kamel, M. W., Diaz-Arastia, C. R., et al.: Effect of TNF- $\alpha$  on estrogen metabolism and endometrial cells: potential physiological and pathological relevance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2009, 94(1), 285–293.
- [23] Rovinsky, J., Kvtnansky, R., Radikova, Z., et al.: Hormone concentrations in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2005, 23(3), 292–296.
- [24] Rovinsky, J., Simorova, E., Radikova, Z., et al.: Comparison of hormone transfer to pleural and synovial exudates. *Endocr. Regul.*, 2006, 40(2), 29–36.
- [25] Castagnetta, L. A., Carruba, G., Granata, O. M., et al.: Increased estrogen formation and estrogen to androgen ratio in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 2003, 30(12), 2597–2605.
- [26] Mosli, H. A., Al-Abd, A. M., El-Shaer, M. A., et al.: Local inflammation influences oestrogen metabolism in prostatic tissue. *BJU Int.*, 2012, 110(2), 274–282.
- [27] Ziegler, R. G., Faupel-Badger, J. M., Sue, L. Y., et al.: A new approach to measuring estrogen exposure and metabolism in epidemiologic studies. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2010, 121(3–5), 538–545.
- [28] Westerlind, K. C., Gibson, K. J., Evans, G. L., et al.: The catechol estrogen, 4-hydroxyestrone, has tissue-specific estrogen actions. *J. Endocrinol.*, 2000, 167(2), 281–287.
- [29] Capellino, S., Montagna, P., Villaggio, B., et al.: Hydroxylated estrogen metabolites influence the proliferation of cultured human monocytes: possible role in synovial tissue hyperplasia. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2008, 26(5), 903–909.
- [30] Franke, A. A., Custer, L. J., Morimoto, Y., et al.: Analysis of urinary estrogens, their oxidized metabolites and other endogenous steroids by benchtop orbitrap LCMS versus traditional quadrupole GCMS. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 401(4), 1319–1330.
- [31] Thijssen, J. H., Blankenstein, M. A., Donker, G. H., et al.: Endogenous steroid hormones and local aromatase activity in the breast. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1991, 39(5B), 799–804.
- [32] EPA: Aromatase assay (Human Recombinant). OCSPP Guideline 890.1200. EPA, Washington, 2011.
- [33] Soldin, S. J., Soldin, O. P.: Steroid hormone analysis by tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.*, 2009, 55(6), 1061–1066.
- [34] Hsing, A. W., Stanczyk, F. Z., Bélanger, A., et al.: Reproducibility of serum sex steroid assays in men by RIA and mass spectrometry. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2007, 16(5), 1004–1008.
- [35] Faupel-Badger, J. M., Fubman, B. J., Xu, X., et al.: Comparison of liquid chromatography-tandem mass spectrometry, radioimmunoassay, and enzyme-linked immunosorbent assay methods for measurement of urinary estrogens. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2010, 19(1), 292–300.

- [36] *Kushmir, M. M., Rockwood, A. L., Roberts, W. L., et al.*: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for analysis of steroids in clinical laboratories. *Clin. Biochem.*, 2011, 44(1), 77–88.
- [37] *Fuhrman, B. J., Xu, X., Falk, R. T., et al.*: Assay reproducibility and interindividual variation for 15 serum estrogens and estrogen metabolites measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2014, 23(12), 2649–2657.
- [38] *Peng, J., Xu, X., Mace, B. E., et al.*: Estrogen metabolism within the lung and its modulation by tobacco smoke. *Carcinogenesis*, 2013, 34(4), 909–915.
- [39] *Miltenyi Biotec*: Flow cytometry analysis of Th subsets. Application note, February 2015. [http://www.miltenyibiotec.com/~media/Files/Navigation/Cell%20analysis/resources/App\\_note-20320\\_Tcell\\_subsets\\_05\\_WEB.ashx](http://www.miltenyibiotec.com/~media/Files/Navigation/Cell%20analysis/resources/App_note-20320_Tcell_subsets_05_WEB.ashx)
- [40] *BD Biosciences*: Novel multicolor flow cytometry tools for the study of CD4+ T-cell differentiation and plasticity. [https://www.bdbiosciences.com/documents/tcell\\_brochure.pdf](https://www.bdbiosciences.com/documents/tcell_brochure.pdf)
- [41] *Erdei, A., Sármay, G., Prechl, J.*: Role of CD4+ T-lymphocytes in triggering of adaptive immune response. [A CD4+ T-limfociták szerepe az adaptív immunválasz kiváltásában.] [http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011\\_0001\\_524\\_Immunologia/ch13s02.html](http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011_0001_524_Immunologia/ch13s02.html) [Hungarian]
- [42] *Randox Laboratories*: Biochip immunoassays – Multiplex testing you can trust. <http://www.randox.com/biochip-immunoassays/testing>
- [43] *Kanhere, A., Hertweck, A., Bhatia, U., et al.*: T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements. *Nat. Commun.*, 2012, 3, 1268. doi: 10.1038/ncomms2260
- [44] *Chakir, H., Wang, H., Lefebvre, D. E., et al.*: T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3. *J. Immunol. Methods*, 2003, 278(1–2), 157–169.
- [45] *Li, X., Sun, Q., Zhang, M., et al.*: The diagnostic value of transcription factors T-bet/GATA3 ratio in predicting antibody-mediated rejection. *Clin. Dev. Immunol.*, 2013, 2013, ID 460316.
- [46] *Cutolo, M., Brizzolara, R., Atzeni, F., et al.*: The immunomodulatory effects of estrogens: clinical relevance in immune-mediated rheumatic diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2010, 1193, 36–42.
- [47] *Catley, M. C., Birrell, M. A., Hardaker, E. L., et al.*: Estrogen receptor beta: expression profile and possible anti-inflammatory role in disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2008, 326(1), 83–88.
- [48] *Lateef, A., Petri, M.*: Hormone replacement and contraceptive therapy in autoimmune diseases. *J. Autoimmun.*, 2012, 38(2–3), J170–J176.
- [49] *Leventhal, L., Brandt, M. R., Cummons, T. A., et al.*: An estrogen receptor-beta agonist is active in models of inflammatory and chemical-induced pain. *Eur. J. Pharmacol.*, 2006, 553(1–3), 146–148.
- [50] *Roman-Blas, J. A., Castañeda, S., Cutolo, M., et al.*: Efficacy and safety of a selective estrogen receptor  $\beta$  agonist, ERB-041, in patients with rheumatoid arthritis, a 12-week, randomized, placebo-controlled, phase II study. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*, 2010, 62(11), 1588–1593.
- [51] *Bertolini, E., Letho-Gyselinck, H., Prati, C.*: Rheumatoid arthritis and aromatase inhibitors. *Joint Bone Spine*, 2011, 3(1), 62–64.

(Vásárhelyi Barna dr.,  
Budapest, Nagyvárud tér 4., 1089  
e-mail: vasarhelyi.barna@med.semmelweis-univ.hu)

Az *Orvosi Hetilap* egyes számai megvásárolhatók a Mediprint Orvosi Könyvesboltban.

Cím: Budapest V., Múzeum krt. 17. – Telefon: 317-4948